

⑪ 公開特許公報 (A)

昭62-58166

⑤Int.Cl. ⁴ G 01 N 30/88 21/76 33/82 // G 01 N 33/15	識別記号 C-7621-2G 8305-2G 8305-2G 7906-2G	厅内整理番号 審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)	④公開 昭和62年(1987)3月13日
----------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------	---------------------------------	----------------------

⑤発明の名称 混合ビタミン剤中の水溶性ビタミン類の同時定量法

②特願 昭60-198734

②出願 昭60(1985)9月9日

特許法第30条第1項適用 昭和60年3月10日 社団法人日本薬学会発行の「日本薬学会第105年会講演要旨集」に発表

⑦発明者 小川原 浩	成田市加良部4-22-2-504
⑦発明者 洞口 靖	成田市飯田町202-124
⑦発明者 諸井 政己	船橋市高根台2-2-27-306
⑦発明者 西村 征男	佐倉市ユーカリが丘1-44-11
⑦出願人 エスエス製薬株式会社	東京都中央区日本橋浜町2丁目12番4号
⑦代理人 弁理士 有賀 三幸	外2名

明細書

〔産業上の利用分野〕

1. 発明の名称

混合ビタミン剤中の水溶性ビタミン類の同時定量法

本発明は混合ビタミン製剤中の水溶性ビタミン類の同時定量法に関する。

2. 特許請求の範囲

1. 混合ビタミン製剤を、次の①～④、

① 極性溶媒

を用いて、本明細書において、水溶性ビタミン類とは、アスコルビン酸、塩酸チアミン、リノ酸リボフラビンナトリウム、塩酸ピリドキシン、ニコチン酸アミド、パントテノール等のビタミンをいう。

② リン酸緩衝液

③ イオン対試薬

〔従来の技術〕

よりなる移動相を用いたイオン対クロマトグラフに付し、次いで溶離液を発螢光試薬としてオルトフタルアルdehyドを用いた発螢光法で分析することを特徴とする混合ビタミン製剤中の水溶性ビタミン類の同時定量法。

従来、混合ビタミン製剤中のビタミン類の定量は、個々のビタミンごとに比色法、UV法、滴定法、微生物学的定量法等の手分析で行われ、多くの労力と時間を必要とする作業であつた。

3. 発明の詳細を説明

ところが、最近の高速液体クロマトグラフ

法の技術上の進歩と相俟つて、ここ数年以内に高速液体クロマトグラフ法による水溶性ビタミン類の同時定量法が数多く報告されてた〔ジャーナル・オブ・ファーマシューイティカル・サイエンス (Journal of Pharmaceutical Science) 70, 1014~1017 (1981); 同、70, 90~101 (1981); 同、67, 1444~1446 (1978)〕。これらは充填剤にイオン交換樹脂を用いイオン交換作用によつて分離する方法と非極性充填剤を用いた逆相クロマトグラフ法に大別できる。

而して、近年では後者の逆相クロマトグラフ法、就中、移動相に適当な対立イオンを加えイオン対を形成させ、非極性固定相により分離するイオン対クロマトグラフ法が主流と

なつている。

[発明が解決しようとする問題点]

しかしながら、これらの同時定量法では、上記水溶性ビタミンの全てを同時定量する事とはできない。すなわち、水溶性の医薬品に繁用されているリン酸リボフラビンナトリウムを、由来の不純物、分解物及び塩酸チアミン、塩酸ピリドキシン、アスコルビン酸、ニコチン酸アミドから分離定量したという報告はない。また、パントテノールについては、そのUV吸収が波長200 nm付近にあるだけで、それ以外で吸収が全くないために、他の水溶性ビタミン類との同時測定は困難であった。

[問題点を解決するための手段]

斯かる実状において、本発明者らは鋭意研究の結果、上記水溶性ビタミン類の同時定量に最適な移動相を用いたイオン対クロマトグラフ法と、この移動相に関して至適なオルトフタルアルdehyド発螢光によるパントテノール検出法を組み合せることにより、上記の水溶性ビタミン類を一括同時に、しかも迅速かつ高精度に定量することができることを見出し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、混合ビタミン製剤を、次の①～③、

① 極性溶媒

② リン酸緩衝液

③ イオン対試薬

よりなる移動相を用いたイオン対クロマトグ

ラフに付し、次いで溶離液を発螢光試薬としてオルトフタルアルdehyドを用いた発螢光法により分析することを特徴とする混合ビタミン製剤中の水溶性ビタミン類の同時定量法を提供するものである。

以下、本発明方法を、これに使用される分析装置の一例を示す第1図と共に説明する。

分析装置は、Aで示されるイオン対クロマトグラフと、これに直列に接続されたBで示されるパントテノール検出システムよりなっている。イオン対クロマトグラフAは、1で示されるカラムと2で示されるUV検出器及び3で示される移動相等よりなるもので、通常のクロマトグラフと同様の構成を有する。また、パントテノール検出システムBは、発

螢光試薬としてオルトフタルアルデヒドを用いた発螢光法（以下、OPA発螢光法という）を行なうためのB-1で示されるOPA発螢光システムとB-2で示される螢光検出器よりなつている。OPA発螢光システムB-1は、3つの反応管が直列に接続したもので、パントテノールをOPA発螢光法により検出するためのものである。

イオン対クロマトグラフAによるクロマト操作は常法に従つて行なうことができる。カラム1としては、シリカゲル担体にオクタデシルシラン処理を施して得られるもの、例えばTSK-Gel ODS-120T〔東洋曹達工業製〕、ムーボンダパックC₁₈（米国ウオーターズ社製）等が挙げられるが、就

シスルホン酸ナトリウム、ヘキサンスルホン酸ナトリウム、ヘプタンスルホン酸ナトリウム等が挙げられるが、就中、ペンタンスルホン酸ナトリウムが特に好ましい。イオン対試薬は、移動相の全組成中に0.05～0.2wt%（%）となるように配合するのが好ましく、この範囲以外では良好な分離が得られない。なお、移動相は、通常1.0ml/分程度の流量で送液される。

またUV検出器2では、270～280nmの波長で検出を行なうのが好ましい。

斯くしてイオン対クロマトグラフ分析を行なうと、アスコルビン酸、ニコチン酸アミド、塩酸ピリドキシン、パントテノール、塩酸チアミン、リン酸リボフラビンナトリウムの順

中TSK-Gel ODS-120Tが好ましい。

移動相3としては、リン酸緩衝液、極性溶媒及びイオン対試薬よりなる溶液が使用される。極性溶媒としては、エタノール、メタノール等が挙げられるが、特にメタノールが好ましい。リン酸緩衝液は、水にリン酸一カリウムを添加し、リン酸によつてpHを調整したもので、リン酸一カリウム濃度が0.01～0.02M、pHが3.0～3.5のものが特に好ましい。リン酸緩衝液と極性溶媒の混合比率は、一般に80：20～90：10となるよう調整するが、極性溶媒がメタノールの場合には84：16とするのが特に好ましい。また、イオン対試薬としては、例えはペント

で溶出される。しかし、パントテノールは、270～280nmにUV吸収がないためここでは検出できず、OPA発螢光法によるパントテノール検出システムBによつて初めて定量可能となる。

OPA発螢光システムB-1は、3つの反応管を有し、反応管aでは溶離液に一定濃度のアルカリ溶液を加え、加温してパントテノールをタ-アラニンに加水分解する。反応管bでは、加水分解後、酸を加えて中和を行なう。次いで、反応管cにおいて、前処理の溶離液にオルトフタルアルデヒドを含有する発螢光試液を加えて螢光物質を生成せしめた後、螢光検出器B-2で定量する。

アルカリ溶液としては、水酸化ナトリウム

水溶液が好ましく、濃度は1～2規定とし、
0.1 ml/分程度の流量で加えるのが好ましい。
また、酸は使用したアルカリ溶液と同濃度にして同じ流量で添加する。加水分解温度は80～90℃が好ましく、これ以上では例えば移動相の極性溶媒としてメタノールを用いた場合、気泡が発生し分析精度が低下してしまう。発螢光試液としては、0.05%オルトフタルアルデヒドを含むpH 9.0 ホウ酸緩衝液が好ましく、反応温度は50℃程度が好ましい。発螢光検出は、励起波長345 nm、検出波長455 nmで行なうのが好適である。なお、発螢光試液は、通常1.0 ml/分程度の流量で送液される。

〔作用〕

本発明に使用される移動相は、水溶性ビタミン類及びそれら由来の不純物、分解物を良好に溶解する。また、オルトフタルアルデヒドは、この溶解液において螢光物質への誘導体化を行なうことができる。

〔発明の効果〕

本発明は以上の如き方法であるため、一回の分析で製剤中の塩酸チアミン、リン酸リボフラビンナトリウム、アスコルビン酸、塩酸ピリドキシン、ニコチン酸アミド、及びパントテノール等の水溶性ビタミン類を定量することが可能である。従来の高速液体クロマトグラフ法の技術では、これらの中で同時に定量可能なものは3成分程度が限界であり、他の成分は個々に螢光法、滴定法、比色法等で

実施しなければならなかつた。従つて、本発明方法によれば、操作時間は1時間以内、精度面においても98%以上の信頼率で定量分析を行なうことが可能であり、本発明は製剤分析において非常に有効なものである。

〔実施例〕

次に実施例を挙げて説明する。

実施例1

下記方法により輸液用混合ビタミン剤中の水溶性ビタミン類の定量を行なつた。

(1) 操作法

アスコルビン酸100 mg、ニコチン酸アミド20 mg、塩酸ピリドキシン3 mg、塩酸チアミン10 mg、リン酸リボフラビンナトリウム2 mg、パンテール5 mgに対応する試料(本

品1 ml)を正確に量り、移動相を加えて正確に100 mlとし(以下、標準溶液といふ)、次の条件で液体クロマトグラフに付し、上記6成分を同時定量する。

輸液用混合ビタミン剤についても同様に操作を行ない、標準溶液の結果と比較する。

(2) 分離条件

カラム条件: TSK-Gel ODS-120T

カラム管: 内径4 mm 長さ25 cm

移動相: 0.01 M リン酸カリウム溶液

(pH 3.5)・メタノール(250

:50)+0.1% 1-ペンタ

ンスルホン酸ナトリウム

流出速度: 1.0 ml/分

検出波長: UV 277 nm

カラム温度：室温

ルカブトエタノール、10%エ

注入量：20ml

タノールを含むpH 9.0 ホウ酸

(3) 使用装置

島津LC-3A型高速液体クロマトグラフ

緩衝液

(4) パントテノール検出条件

流量：1.0 ml/分

(1) 加水分解

反応温度：50°C

アルカリ溶液：2N-水酸化ナトリウム

(5) 試料(注射剤)

流量：0.1 ml/分

使用した試料は次の処方である。

反応温度：90°C

(処方)

(2) 中和

酸：2N-塩酸

ビタミンA 10,000IU

流量：0.1 ml/分

エルゴカルシフェロール 1,000IU

反応温度：室温

酢酸トコフェロール 5mg

(3) 発螢光反応

塩酸チアミン 50mg

発螢光試液：0.05%OPA、0.2%2-メ

リン酸リボフラビンナトリウム 10mg

パントテノール 25mg

塩酸ピリドキシン 15mg

アスコルビン酸 500mg

ニコチン酸アミド 100mg

注射用蒸留水で5mlとする。

上記4成分を同時定量する。

(6) 本発明方法により検出した各成分のピーク
は第1図の通りである。

(2) 分離条件

実施例2

実施例1と同様。

下記方法により内服用ビタミン剤中の水溶
性ビタミン類の定量を行なつた。

(3) 使用装置

(1) 操作法

実施例1と同様。

ニコチン酸アミド15mg、塩酸チアミン10
mg、リン酸リボフラビンナトリウム2mg、パ
ントテニルアルコール30mgに対応する試料
(本品20ml)を正確に量り、移動相を加え
て正確に100mlとし(以下、標準溶液とい
う)、次の条件で液体クロマトグラフに付し、

(4) パントテノール検出条件

実施例1と同様。

(5) 試料(液剤)

使用した試料は次の処方である。

(処方)

桂枝湯流エキス	500mg
ニンジン流エキス	50mg
塩酸チアミン	10mg
リン酸リボフラビンナトリウム	2mg
メチルヘスペリシン	10mg

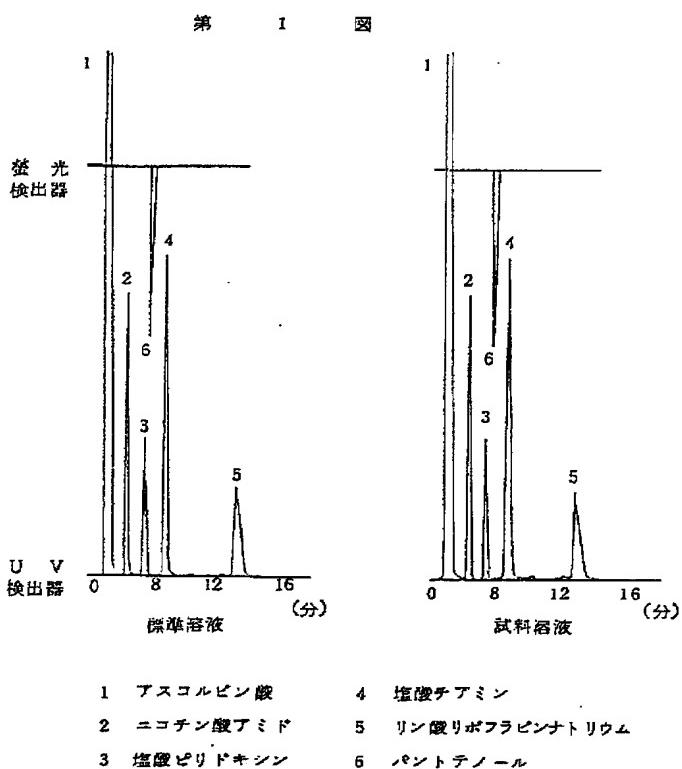
ニコチニ酸アミド 1.5 mg
 パントテノール 3.0 mg
 シヤコウテンキ 0.05 ml
 ゴオウテンキ 0.05 ml
 精製水にて 2.0 ml とする。

(6) 本発明方法により検出した各成分のピークは第2図の通りである。

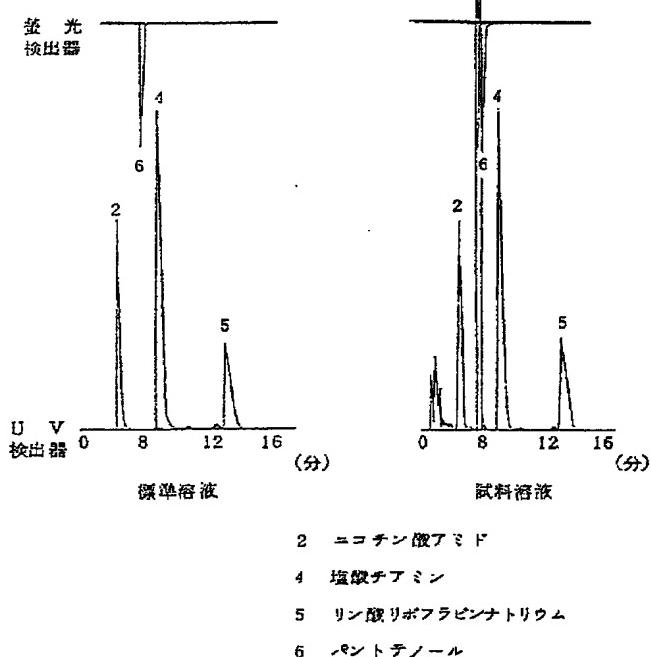
4. 図面の簡単な説明

第1図は輸液用混合ビタミン剤を本発明方法で分析したときのクロマトグラム、第2図は内服用ビタミン剤を本発明方法で分析したときのクロマトグラム、第3図は本発明方法に使用される分析装置の一例を示す概略説明図である。

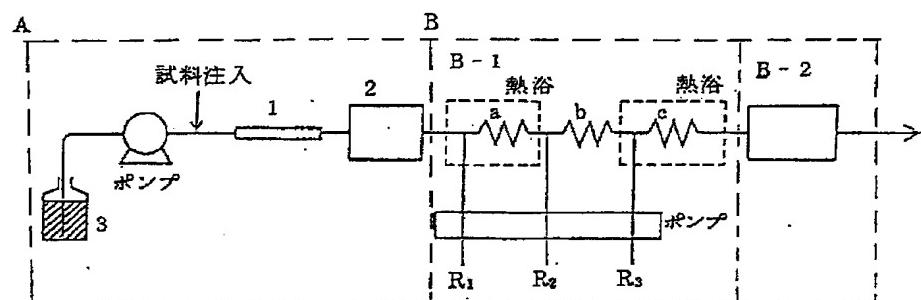
以上



第2図



第 3 図



- A イオン対クロマトグラフ
 B パントテノール検出システム
 B-1 O.P.A 発螢光システム
 B-2 螢光検出器
 1 カラム
 2 UV検出器
 3 移動相
 a, b, c 反応管
 R₁ アルカリ溶液
 R₂ 酸
 R₃ 発螢光試験

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成5年(1993)5月7日

【公開番号】特開昭62-58166

【公開日】昭和62年(1987)3月13日

【年通号数】公開特許公報62-582

【出願番号】特願昭60-198734

【国際特許分類第5版】

G01N 30/88 C 7621-2J

21/76 7235-2J

33/82 7055-2J

// G01N 33/15 7906-2J

手 続 補 正 書 (口発)

平成4年4月6日

特許庁長官 深沢 亘殿

1. 事件の表示

昭和60年特許願第198734号

2. 発明の名称

混合ビタミン剤中の水溶性ビタミン類の同時定量法

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

名 称 エスエス製薬株式会社

4. 代理人

住 所 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号(〒103)

共同ビル 電話(3669)0904號

氏 名 (6870)弁理士 有賀 三幸

住 所 同 上

氏 名 (7756)弁理士 高野 登志雄

5. 補正命令の日付

自 発

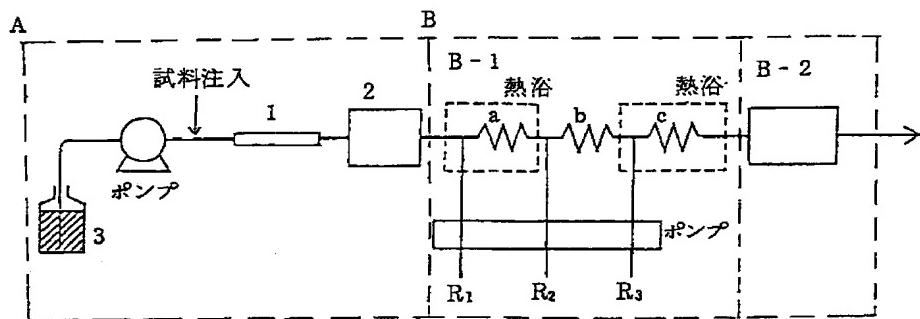
6. 補正の対象

図面

7. 補正の内容

(1) 第3図を別添の如く訂正する。

第 3 図



- A イオン対クロマトグラフ
- B パントテノール検出システム
- B-1 O P A 発螢光システム
- B-2 螢光検出器
- 1 カラム
- 2 UV検出器
- 3 移動相
- a、b、c 反応管
- R₁ アルカリ溶液
- R₂ 酸
- R₃ 発螢光試液

METHOD FOR SIMULTANEOUS QUANTITATIVE ANALYSIS OF WATER-SOLUBLE VITAMINS IN MIXED VITAMIN PREPARATION

Publication number: JP62058166 (A)

Also published as:

Publication date: 1987-03-13

JP7001257 (B)

Inventor(s): OGAWARA HIROSHI; HORAGUCHI YASUSHI; MOROI MASAMI; NISHIMURA MASAO

JP1976418 (C)

Applicant(s): SS PHARMACEUTICAL CO

Classification:

- **international:** G01N21/76; G01N21/78;
G01N30/26; G01N30/74;
G01N30/88; G01N33/15;
G01N33/82; G01N21/76;
G01N21/77; G01N30/00;
G01N33/15; G01N33/82; (IPC1-
7): G01N21/76; G01N30/88;
G01N33/15; G01N33/82

- **European:**

Application number: JP19850198734 19850909

Priority number(s): JP19850198734 19850909

Abstract of JP 62058166 (A)

PURPOSE: To enable the quantification of water-soluble vitamins in a mixed vitamin preparation by one analysis, by subjecting the mixed vitamin preparation to an ion-pair chromatograph using a mobile phase consisting of a polar solvent, a phosphate buffer solution and an ion-pair reagent and subsequently analyzing the eluate by a fluorescent method using o-phthalaldehyde as a fluorescent reagent. **CONSTITUTION:** The simultaneous quantitative analysis of water-soluble vitamins in a mixed vitamin preparation can be rapidly performed with high accuracy by combining an ion-pair chromatograph method using a mobile phase consisting of a polar solvent, a phosphate buffer solution and an ion-pair reagent with a pantenol detection method according to an ortho-phthalaldehyde fluorescent method optimum to said mobile phase.; As the polar solvent, methanol is especially pref. and, as the phosphate buffer solution, one with a phosphate-potassium concn. of 0.01-0.02M and pH3-3.5 is especially pref. As the ion-pair reagent, sodium pentasulfonate is especially pref.

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide